

Universidade de Lisboa
Faculdade de Medicina Dentária



Estudo *in vitro* da resistência adesiva à dentina cariada e análise morfológica da interface

Ana Margarida Henriques Martins

Dissertação

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2018

Universidade de Lisboa

Faculdade de Medicina Dentária



Estudo *in vitro* da resistência adesiva à dentina cariada e análise morfológica da interface

Ana Margarida Henriques Martins

Dissertação orientada
Pela Prof.^a Doutora Sofia Arantes e Oliveira

Mestrado Integrado em Medicina Dentária

2018

Agradecimentos

Em primeiro lugar, à Professora Doutora Sofia Arantes e Oliveira, por toda a sua disponibilidade, atenção e compreensão ao orientar-me nesta tese de mestrado, assim como também pela boa disposição e por ter apadrinhado este meu sonho de há algum tempo que era a investigação laboratorial.

À Professora Doutora Filipa Chasqueira pela ajuda e incentivo adicionais com que me brindou aquando da elaboração deste estudo.

À Daniela Abreu, por todas as horas despendidas dentro e fora do laboratório a auxiliar-me ou clarificar as minhas dúvidas, bem como as dos meus colegas Nuno e Filipe, aos quais também quero agradecer o apoio incondicional e as cantorias naquelas horas a fio de trabalho.

À minha dupla Natália, por ser o meu braço direito, esquerdo, pernas, pés e boia de salvação na clínica. Por suportar o meu mau humor matinal e as minhas frases menos bem conseguidas, fazendo de mim uma melhor profissional e uma (espero) boa companheira desta viagem que ficará para sempre nas nossas memórias. Obrigada também à Ana e à Maria por serem as minhas irmãs mais velhas e sábias, mas não por isso menos brincalhonas, completando assim a tripla maravilha destes anos clínicos.

Aos meus pais, por serem quem são e por me ajudarem a transformar-me no que sou. Por me terem dado todas as oportunidades que tive, por sempre me apoiarem, por acreditarem em mim quando nem eu o conseguia fazer, por serem definitivamente os melhores pais do mundo.

Aos que me guiaram nesta vida selvagem lisboeta: à minha tia Isabel, por me acolher como uma filha; aos meus primos Gonçalo e Ricardo, por me tratarem como irmã; à Jennie, pelo seu sorriso contagiante e por toda a paciência ao ouvir o meu suposto sueco e as minhas conversas eurovisivas; à Alma, por ser a mais recente alegria e fofura dos nossos dias; à D. Irene, pelos nossos bolinhos e por me ter deixado “ser sua neta”. E a todos, pelo calor humano com que sempre tão bem me receberam, fazendo-me sentir em casa.

Ao André, por ter entrado na minha vida há 5 anos atrás e ter sido, desde o primeiro dia, a pessoa com quem posso contar sempre, seja em horas seguidas de

gargalhadas, seja nos momentos em que não vejo a luz ao fundo do túnel ou até quando ajo menos bem e preciso que me chamem de novo à realidade. Obrigada por seres o irmão que nunca tive, por todas as aventuras e alegrias, por esta amizade verdadeira que atravessa um oceano e que eu tudo farei para que perdure o resto das nossas vidas.

À Joana, por ser a outra metade do meu novo coração renascido no início deste curso, juntas pelo azar, que acabou por se revelar a sorte grande. Apesar de separadas por quase 300 quilómetros nos últimos anos, quero agradecer-te por teres estado sempre tão incrivelmente presente, por tantas horas de conversa e apoio mútuo, mas principalmente pela tua amizade de ouro. Que estejamos sempre disponíveis uma para a outra como tem sido até agora.

Ao Luís, porque é das situações mais difíceis que nascem as ligações mais fortes. Por todas as palavras mais duras que escondiam um ‘gosto muito de ti’, assim como por todos os dias de silêncio que traziam consigo um ‘preciso de falar contigo’. É fácil errar, mas é especialmente difícil admiti-lo. Havemos de discordar muitas mais vezes, mas que tenhamos, como no passado, força de vontade para não deixar que nada se sobreponha a esta amizade porque, no fundo, não conseguimos viver um sem o outro.

À família que eu escolhi e descobri nesta vida académica: André, Daniela, Dayana, Filipe, Karina, Luís, Maria, Mónica L., Mónica M. e Sara. O que quer que eu escreva nunca vai refletir o que vocês significam para mim, o quão agradecida estou por vos ter ao meu lado e o quanto vos adoro. O apoio e o companheirismo que nos uniu e que muitos julgam ser impossível de existir verdadeiramente foram, muitas vezes, a única razão que me fez acreditar que dias melhores viriam aí, que tudo era possível. Conseguimos, Padaria! Não é de sempre, mas é, sem sombra de dúvidas, para sempre.

Para terminar, quero agradecer à minha avó Maria da Luz, por ser a minha grande inspiração, a pessoa que eu mais admiro e que mais agradeço por fazer parte da minha vida. Obrigada por me teres transmitido toda a tua garra, coragem, sensatez, tudo o que faz de ti a melhor pessoa que eu alguma vez conhecerei, e espero um dia poder vir a ser tudo o que me disste que iria conseguir. És e sempre serás a estrela que mais ilumina o meu céu.

Resumo

Objetivo: Avaliar se o substrato (dentina cariada vs. dentina saudável) tem influência na morfologia da interface adesiva e na resistência adesiva à microtração às 24 horas do adesivo *All-Bond Universal*[®], no modo *etch&rinse*, sujeito a pressão pulpar.

Materiais e Métodos: 40 molares humanos foram testados, encontrando-se divididos em 2 grupos: Grupo A – Dentes com lesão de cárie envolvendo dentina; Grupo B – Dentes hígidos (controlo). Após aplicação do sistema adesivo e restauração em resina composta, os espécimes foram armazenados a 37 °C durante 24 horas, sendo posteriormente cortados de modo a obter palitos para o estudo da resistência adesiva, sendo 3 espécimes de cada grupo direcionados para a observação em microscopia eletrónica de varrimento (MEV). Os resultados do teste de microtração foram analisados segundo os testes *Shapiro-Wilk* e *Levene*, não sendo garantidos os pressupostos de normalidade e homogeneidade, utilizando-se para comparação entre grupos o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*.

Resultados: Relativamente à análise da resistência adesiva, verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre substratos ($p < 0,05$), sendo os valores dos espécimes do Grupo B mais elevados. Na análise das interfaces adesivas em MEV, foram também detetadas diferenças, exibindo os espécimes do Grupo A uma camada híbrida de fina ou mesmo indetetável, com prolongamentos de resina de pequenas dimensões. Já nos espécimes do Grupo B, a camada híbrida observada é mais espessa e os prolongamentos resinosos de grandes comprimentos, possuindo até prolongamentos acessórios.

Conclusões: Os valores de resistência adesiva após 24 horas foram mais elevados nos espécimes do Grupo B. Verificaram-se diferenças na interface adesiva consoante o substrato dentinário. São necessários mais estudos para comprovar que a *performance* em dentina cariada do sistema adesivo estudado é, de facto, pior do que em dentina saudável.

Palavras-Chave: sistema adesivo universal, dentina cariada, pressão pulpar, microtração, camada híbrida, microscópio eletrónico de varrimento

Estudo *in vitro* da resistência adesiva à dentina cariada e análise morfológica da interface

Abstract

Objectives: To evaluate whether the substrate (healthy vs. carious dentin) has influence on the morphology of the adhesive interface and on the 24 hours microtensile bond strengths promoted by the adhesive system *All-Bond Universal*[®], in *etch&rinse* mode and under pulpal pressure.

Materials and Methods: 40 human molars were tested, divided into 2 groups: Group A – Teeth with a single carious lesion involving dentine; Group B – Healthy teeth (control). After adhesive procedures and consequent composite restoration, the specimens were stored for 24 hours in an incubator, and were then cut to be submitted to microtensile bond strength testing as well as scanning electron microscope (SEM) observation. The microtensile bond strength results were analyzed by *Shapiro-Wilk* and *Levene*, not guaranteeing the normality and homogeneity assumptions. Therefore, the comparison of the results was made with non-parametric *Mann-Whitney* test.

Results: Microtensile bond strength differences between the experimental groups were detected ($p < 0,05$), with higher values being recorded on the specimens from Group B. Concerning the SEM observation, there were differences between groups as well: specimens from Group A had a thin hybrid layer and many small length resin tags were present; In specimens from Group B, the hybrid layer was thicker, containing many and long resin tags, with accessory extensions.

Conclusions: There were differences in the interface depending on the substrate where the adhesive was applied. The 24 hours microtensile bond strengths to healthy dentin were significantly higher than those to carious dentin. Further studies are required to prove that the adhesive system studied has in fact a worst performance in carious dentine.

Keywords: universal adhesive system, carious dentine, pulpal pressure, microtensile bond strength, hybrid layer, scanning electron microscopy

Estudo *in vitro* da resistência adesiva à dentina cariada e análise morfológica da interface

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	v
Lista de figuras	ix
Lista de tabelas	x
Abreviaturas	xi
Símbolos	xi
Unidades	xi
1. Introdução	1
2. Objetivos	5
3. Materiais e Métodos	6
3.1. Protocolo experimental	6
3.2. Materiais Utilizados	7
3.3. Amostra	7
3.4. Ensaio experimental	8
3.5. Ensaio de resistência adesiva à microtração	10
3.6. Caracterização morfológica da interface adesiva com microscopia eletrônica de varrimento (MEV)	10
3.7. Análise estatística	12
4. Resultados	13
4.1. Análise dos valores de microtração	13
4.2. Caracterização morfológica da interface adesiva em MEV	14
5. Discussão	17
6. Conclusão	22
7. Referências Bibliográficas	23
Apêndice A – Tabelas	I

Estudo *in vitro* da resistência adesiva à dentina cariada e análise morfológica da interface

Lista de Figuras

- Figura 1.** Representação esquemática do protocolo experimental 6
- Figura 2.** Gráfico demonstrativo do modo de falha de cada grupo estudado, em percentagem. A – Falha Adesiva; CC – Falha Coesiva de Compósito; CD – Falha Coesiva de Dentina; M – Falha Mista 14
- Figura 3.** Imagens obtidas através de MEV da interface adesiva após aplicação do adesivo no modo *etch&rinse*, submetido a pressão pulpar positiva, em dentina cariada – Grupo A (A). Imagens A1, A4 e A7 – ampliação 200 x; Imagens A2, A5 e A8 – ampliação 1000 x; Imagens A3, A6 e A9 – ampliação 2000 x. C – Compósito. A – Adesivo. H – Camada Híbrida. F – Falha. D – Dentina. Seta branca – Prolongamentos de resina. Seta preta – prolongamentos acessórios 15
- Figura 4.** Imagens obtidas através de MEV da interface adesiva após aplicação do adesivo no modo *etch&rinse*, submetido a pressão pulpar positiva, em dentina hígida – Grupo B (B). Imagens B1, B4 e B7 – ampliação 200 x; Imagens B2, B5 e B8 – ampliação 1000 x; Imagens B3, B6 e B9 – ampliação 2000 x. C – Compósito. A – Adesivo. H – Camada Híbrida. F – Falha. D – Dentina. Seta branca – Prolongamentos de resina. Seta preta – prolongamentos acessórios 16

Lista de Tabelas

Tabela 1. Materiais usados e sua respectiva descrição.....	7
Tabela 2. Valores de média, desvio padrão, mínimo e máximo de resistência adesiva à microtração, em MPa, por grupo experimental. Letras em <i>superscript</i> diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$)	13
Tabela A.1. Fotografias da face oclusal e radiografias periapicais dos espécimes cariados numerado de 1 a 8	I
Tabela A.2. Fotografias da face oclusal e radiografias periapicais dos espécimes cariados numerado de 9 a 16	II
Tabela A.3. Fotografias da face oclusal e radiografias periapicais dos espécimes cariados numerado de 17 a 20	III
Tabela A.4. Testes de <i>Shapiro-Wilk</i> para avaliação da normalidade da distribuição de valores.....	III
Tabela A.5. Testes de <i>Levene</i> para avaliação de homogeneidade da variância.....	IV
Tabela A.6. Testes de <i>Mann-Whitney</i> para avaliação dos valores de microtração entre os grupos experimentais.	IV

Abreviaturas

μ TBS – Forças de microtração (*microtensile bond strength*)

MEV - Microscópio eletrônico de varrimento (*scanning electron microscope*).

Símbolos

% - Percentagem

pH – Potencial de hidrogénio

N – Tamanho da amostra

p – Probabilidade de Significância

Unidades

cmH₂O – centímetros de água - unidade de pressão

μ m – micrómetros - unidade de medida

°C – graus Celsius - unidade de temperatura

mm – milímetros - unidade de medida

MPa – megapascal - unidade de pressão

mW/cm² – *Microwatt* por centímetro quadrado - unidade de intensidade de radiação

M – mol/dm³ - unidade de concentração molar

kV– quilovolts - unidade de tensão elétrica

Estudo *in vitro* da resistência adesiva à dentina cariada e análise morfológica da interface

1. Introdução

O fenómeno da adesão em medicina dentária é tema frequente de estudos e pesquisas, seja com o intuito de testar novos materiais que constantemente surgem no mercado ou de modo a ultrapassar as dificuldades que surgem na sua aplicação, que tem como finalidade promover um contacto íntimo entre tecido dentário e o material de restauração (Baier, 1992).

Os adesivos “*multi-mode*”, mais recentemente denominados de universais, são uma aposta cada vez maior em termos clínicos, (Perdigão & Swift, 2015; Perdigão *et al.*, 2014; Perdigão & Loguercio, 2013), podendo ser utilizados num modo *etch&rinse*, em que a *smear-layer* é removida através de um condicionamento ácido da superfície, ou num modo *self-etch*, no qual a *smear-layer* é apenas modificada, servindo também ela de substrato à adesão (Oliveira *et al.*, 2003; Van Landuyt *et al.*, 2007).

O *All-Bond Universal*[®] é um exemplo deste tipo de adesivos, cuja adesão química entre tecido dentário e o material de restauração, fundamental para o aumento da estabilidade e duração da adesão, é feita através de monómeros funcionais carboxilados e/ou fosfatados, como é o caso do 10-MDP, com capacidade para se ligarem através de ligações iónicas ao cálcio presente na hidroxiapatite (Yoshida *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2012; Yoshihara *et al.*, 2013).

No esmalte, um tecido uniforme e quase totalmente composto por matéria inorgânica, a promoção de uma correta adesão entre este e um material de restauração é muito mais fiável e previsível (Buonocore, 1955, 1973).

As maiores dificuldades em conseguir uma boa adesão fazem-se sentir na dentina, pois a presença de água em grande quantidade e de uma matriz de colagénio (Pashley, 1996), que suporta os cristais de hidroxiapatite, tornam este tecido mais poroso, húmido e com uma maior concentração de matéria orgânica (Pashley, 1992).

A adesão à dentina baseia-se, atualmente, na formação de uma camada híbrida, na qual dentina desmineralizada e a sua malha de colagénio são penetradas por um monómero resinoso que é polimerizado *in situ* (Nakabayashi *et al.*, 1982; Nakabayashi, 1992; Pashley, 1992).

A grande maioria da literatura foca-se na interação destas soluções de monómeros resinosos entre materiais restauradores e tecidos dentários saudáveis (Perdigão, 2007) o que, como sabemos, não se adequa ao dia-a-dia da realidade clínica, uma vez que o uso destes agentes, na sua esmagadora maioria, é feito após remoção de lesões de cárie, sendo o substrato de aplicação um tecido que, por ter estado em contacto com um ambiente de patogenicidade, possui características diferentes das que apresentava na sua forma hígida.

De facto, a evidência científica atual aponta, até, na direção de que a adesão a um substrato cariado é mais desafiadora do que a um substrato saudável (Isolan *et al.*, 2018). Estudos prévios demonstram a formação de uma camada híbrida atípica na interface adesiva em dentina cariada, bem como valores de resistência adesiva menores do que em dentina sem alterações, quando ambas são sujeitas à aplicação de adesivos resinosos (Nakajima *et al.*, 1995; Yoshiyama *et al.*, 2000). As alterações morfológicas patentes na dentina cariada podem levar a uma hibridização mais pobre do tecido (Arrais *et al.*, 2004; Nikaido *et al.*, 2002), bem como a uma reduzida *performance* mecânica das restaurações adesivas (Marshall *et al.*, 2001).

A cárie dentária é uma doença multifatorial, resultante de processos de desmineralização e remineralização da estrutura dentária (Von Der Fehr & Loe, 1970; Kidd & Joyston-Bechal, 1987). A dentina cariada é essencialmente constituída por duas camadas: uma mais exterior, que se encontra infetada (onde temos presença de bactérias), não vital, irreversivelmente desnaturada e fisiologicamente não-remineralizável; e outra mais interna, apenas afetada (sem presença de bactérias), vital, reversivelmente desnaturada e fisiologicamente remineralizável (Fusayama, 1979; Kuboki *et al.*, 1977; Miller & Massler, 1962; Ohgushi & Fusayama, 1975).

A característica química mais óbvia da dentina cariada é a sua perda de material inorgânico (Armstrong, 1964), sendo a remoção da dentina infetada crucial para parar o avanço da lesão cariosa (Atac *et al.*, 2001; Mertz-Fairhurst *et al.*, 1998; Ranly & Garcia-Godoy, 2000).

Aquando da remoção de uma lesão de cárie e após a elaboração de uma cavidade, pequenas partículas de esmalte e dentina combinadas com saliva ou outro líquido presente são forçadas ou esbatidas contra a superfície dentária, formando-se a

denominada *smear-layer* – que cobre também os túbulos dentinários, dando-se neste caso o nome de *smear-plugs* – reduzindo a permeabilidade dentinária (Mjör, 2009).

A remoção desta camada é desejável para uma boa adesão, sendo possível apenas através da aplicação de um agente ácido (Mjör, 2009), sendo este, geralmente, ácido fosfórico com uma concentração entre 30 % e 40 %, com um pH de 0,1–0,4, por um período de 15 segundos (Perdigão, 2002; Sezinando, 2014, Van Meerbeek *et al.*, 2003), possuindo uma capacidade de desmineralização da dentina com 8 a 10 µm de profundidade (Schulze *et al.*, 2005). De seguida, o agente condicionante é lavado com água, que servindo de suporte à rede de colagénio (Perdigão *et al.*, 2013), deve ser posteriormente evaporada de modo a que não se desidrate por completo a dentina, evitando o colapso das fibras de colagénio, o que poderá comprometer os passos seguintes (Kanca, 1992). De outro modo, também não deve ser deixada água em excesso de modo a prevenir a diluição do monómero (Tay & Pashley, 2003), podendo esta ser também uma barreira ao estabelecimento de uma correta adesão (Hashimoto *et al.*, 2006). Podemos assim concluir que este é um procedimento crítico da técnica (Van Meerbeek *et al.*, 2003).

A literatura já existente tem vindo a demonstrar que a aplicação de adesivos no modo *etch&rinse* – descrito no parágrafo anterior – resulta na formação de uma interface adesiva com uma camada híbrida mais espessa, com melhores resultados face a testes de resistência adesiva, bem como a uma maior longevidade da restauração. (Buonocore *et al.* 1968). Esta diferença é explicada através de dois factos: em primeiro lugar, porque o ataque ácido é mais eficaz do que um adesivo *self-etch* a dissolver o tecido superficial, removendo toda a *smear-layer*, expondo as fibras de colagénio, de modo a termos uma maior retenção mecânica com a superfície cariada (Marshall *et al.*, 2001), uma vez que a composição acídica do adesivo *self-etch* é menor, reduzindo o seu potencial de desmineralização e criação de microporosidades (Pashley *et al.*, 2011); em segundo lugar, porque a adesão dos monómeros *self-etch* se baseia na interação com iões de cálcio do tecido (Fujita *et al.*, 2011) que, no caso da dentina cariada, estão presentes em baixas concentrações (Daculsi *et al.*, 1987; Nakajima *et al.*, 2005; Ogawa *et al.*, 1983).

A dentina é atravessada por túbulos dentinários, que ligam a polpa do dente ao exterior, ligação íntima esta que levou à junção dos dois tecidos no chamado órgão

pulpodentinário. Estes túbulos permitem a penetração de monómeros resinosos no seu interior, sendo estes últimos peças chave na obtenção de adesão de restaurações a tecido dentário (Mjör, 2009).

A teoria hidrodinâmica da sensibilidade dentinária afirma que o mecanismo de percepção da dor quando dentina exposta é estimulada prende-se com o movimento do fluido nestes túbulos. A avaliação da permeabilidade dentinária é feita com base neste princípio, tendo-se tornado numa ferramenta útil na deteção de modificações seja no próprio tecido dentinário ou na aplicação de agentes adesivos (Elgalaid *et al.*, 2007).

A pressão pulpar é responsável pela presença de água na dentina, sob a forma de fluído dentinário, promovendo o fluxo deste fluido através dos túbulos dentinários, no sentido do órgão pulpar para o exterior, sendo o valor positivo desta, num dente vital, de 77cmH₂O (Brown & Yankowit, 1964; Van Hassel, 1971; Ciucchi *et al.*, 1995; Pashley & Carvalho, 1997; Sauro *et al.*, 2007).

Sabe-se que a permeabilidade dentinária é muito menor em dentina cariada do que em dentina saudável, mesmo após a remoção da *smear-layer* (Pashley *et al.*, 1991; Tagami *et al.*, 1992), pois a primeira possui túbulos dentinários obstruídos por depósitos minerais e ainda dentina intertubular hipermineralizada (Björndal & Mjör, 2001). Este fenómeno deve-se, maioritariamente, a duas situações: à produção de dentina esclerótica (que corresponde a áreas de hipermineralização) por parte da dentina possuidora da lesão de cárie, e ao surgimento de dentina terciária reparativa como mecanismo de proteção pulpar (Pashley *et al.*, 1991). Já os depósitos intratubulares são formados através da dissolução dos cristais de apatite que compõem a dentina afetada, por parte de ácidos bacterianos, permitindo que os iões cálcio e fosfato se difundam através dos túbulos, precipitando na forma de cristais *whitelockite* (Elgalaid *et al.*, 2007).

Sabendo, então, que as condições fisiológicas e clínicas do substrato influenciam a sua permeabilidade dentinária (Van Hassel, 1971, Reeder *et al.*, 1978), será relevante perceber como se comporta um sistema adesivo universal no modo *etch&rinse* na dentina cariada, um tecido com maior quantidade de água e mais poroso (Armstrong, 1964).

2. Objetivos

Os objetivos deste estudo *in vitro* passam por comparar as forças de resistência adesiva a um substrato de dentina hígida com as forças de resistência adesiva a um substrato de dentina cariada obtidas após 24 horas de adesão com um adesivo universal, aplicado em modo *etch&rinse* e na presença de pressão pulpar artificial.

O objetivo geral foi conseguido através dos objetivos específicos que se seguem:

1. Analisar a influência do substrato nos valores de resistência adesiva de um sistema universal aplicado no modo *etch&rinse*, com presença de pressão pulpar.

H₀: Não se verificam diferenças estatisticamente significativas nos valores de resistência adesiva a cada um dos substratos.

H₁: Verificam-se diferenças significativas nos valores de resistência adesiva a cada um dos substratos.

2. Analisar a morfologia da interface adesiva criada, em dentina hígida e em dentina cariada, com um sistema adesivo universal em modo *etch&rinse* e com presença de pressão pulpar.

3. Materiais e Métodos

3.1. Protocolo experimental

Após a sua análise física e radiográfica, os 40 espécimes da amostra (*N*) foram alocados em igual número a um de 2 grupos:

- Grupo A: Dentes com lesão de cárie envolvendo dentina
- Grupo B: Dentes hígidos (Controlo)

Todos foram reduzidos a discos de dentina e montados num sistema de pressão pulpar, tendo sido restaurados incrementalmente com resina composta Bulk Fill *Tetric EvoCeram*®, com o sistema adesivo *All-Bond Universal*® em modo *etch&rinse*.

De seguida, cada disco foi dividido em dois segmentos iguais, tendo um destes sido observado ao microscópio eletrónico de varrimento, e o outro reduzido a palitos, que foram submetidos a testes de microtração para avaliar a resistência adesiva.

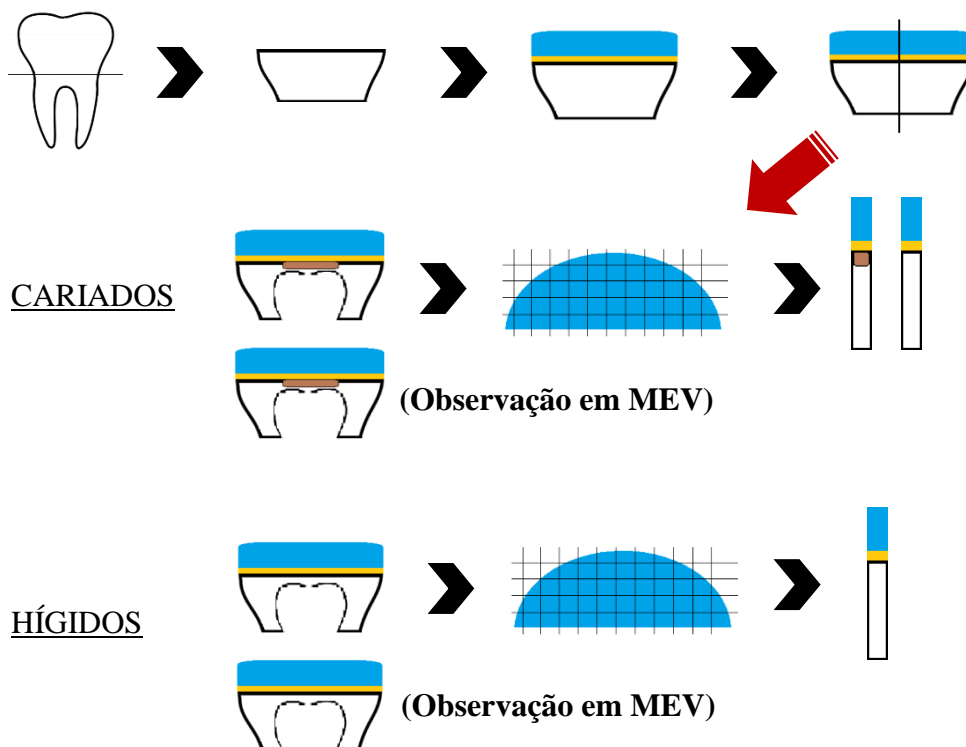


Figura 1. Representação esquemática do protocolo experimental

3.2. Materiais Utilizados

Para a concretização deste estudo, foram utilizados os seguintes materiais:

Material	Identificação	Composição
<i>All-Bond Universal</i> [®]	Bisco Inc EUA Lote: 1700007026 Validade: 06/11/2019	MDP (Monómeros metacrilóxidecil fosfato), Bis-GMA (Bisfenol A glicidil metacrilato), HEMA (2-hidrocietilmetacrilato), etanol/ água e iniciadores pH = 2,5–3,5
<i>Total Etch</i> [®]	Ivoclar Vivadent Liechtenstein Lote: V12807 Validade: 09/2018	Ácido fosfórico a 37% pH<1 a 20 °C
<i>Tetric EvoCeram</i> [®] Bulk Fill	Ivoclar Vivadent Liechtenstein Lote: W14060 Validade: 04/03/2021	Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA (17-18 % do peso), vidro de bário, trifluoreto de itérbio, óxidos mistos (79–81 % do peso), catalisadores, estabilizadores e pigmentos. Tamanho das partículas: 40–3000 nm (tamanho médio: 550 nm)

Tabela 1. Materiais utilizados e a sua respetiva descrição

3.3. Amostra

Para a realização desta investigação foi necessária a recolha de dentes humanos, sendo a mesma realizada sem identificação dos dadores e aprovada pela comissão de ética da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade de Lisboa.

Aquando da sua seleção, os dentes foram primariamente sujeitos a uma análise visual, que os diferenciou entre saudáveis e cariados. Foram selecionados 20 molares humanos definitivos hígidos (não cariados e não restaurados), constituindo o grupo de controlo. Foram analisados 70 dentes cariados para inclusão neste estudo. A presença de lesões de cárie e/ou restaurações foi confirmada através da elaboração de radiografias periapicais a cada um dos espécimes. Foram eleitos para participar na experiência

apenas os que possuíam uma lesão de cárie oclusal, única, não restaurada, com envolvimento de dentina mas sem envolvimento pulpar. De todos os molares humanos definitivos que reuniam estas condições, foram selecionados, recorrendo às imagens radiográficas, os 20 dentes com as lesões de cárie maiores e o mais semelhantes possível (as fotografias e radiografias de cada um dos dentes encontram-se no Apêndice A).

3.4. Ensaio experimental

Os dentes recolhidos foram armazenados numa solução de Cloramina 0,5 %, à temperatura de sensivelmente 4 °C, durante não mais de 2 meses.

Os 40 espécimes foram seccionados na sua junção amelocementária na máquina de corte *Isomet*® 1000 Precision Saw 1000 (nº de série 666-IPS-03518, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), recorrendo a um disco de corte impregnado de diamante (*Isomet*® Diamong Wafering Blades, 12,7''x102''x0,3''), a 400 rpm, tendo as raízes sido descartadas e limpa a câmara pulpar de cada dente.

Após este procedimento, as coroas dos 20 molares cariados (Grupo A) foram desgastadas na polidora (DAP-U, Struers, Denmark) com uma lixa de grão 80 (SiC-Paper, Struers, Denmark) até ser atingida a base da lesão de cárie em dentina pigmentada mas não amolecida. A consistência da dentina cariada nesta zona foi verificada com a utilização de uma cureta de dentina, como seria efetuado durante o ato clínico. Este procedimento foi desenvolvido sempre pelo mesmo operador, com o intuito de haver uma padronização. Foram, assim, obtidos discos de dentina com espessuras entre os 2–3 mm (medição esta feita entre o corno pulpar mais alto e a superfície oclusal). Os 20 espécimes hígidos (Grupo B) foram reduzidos a discos de dentina com espessura igual à anteriormente referida, tendo-se, para este efeito, recorrido novamente ao uso da polidora.

Na face oclusal de todos os discos de dentina foi criada artificialmente uma *smear-layer* com lixa de grão 400 (Buehler, Lake Bluff, EUA), durante 2 minutos.

Com o intuito de simular a pressão pulpar positiva aquando da aplicação do sistema adesivo, utilizou-se um dispositivo com base no mecanismo usado por Sauro *et.*

Al (Sauro et al.,2007). Cada um dos elementos da amostra foi aderido a uma placa de acrílico com etilcianoacrilato (*Loctite*® Super Cola 3, Portugal), sendo a câmara pulpar ligada a um sistema de pressão hidráulico a 77 cmH₂O através de uma agulha 18G, durante 10 minutos, o tempo necessário para garantir que tanto a câmara pulpar como os túbulos dentinários estavam totalmente preenchidos por água destilada.

Foram então feitos os procedimentos adesivos no modo *etch&rinse*, consoante as instruções do fabricante, começando pelo condicionamento ácido da superfície de dentina com ácido fosfórico a 37 % (*Total Etch*®, Ivoclar Vivadent, Liechtenstein), durante 15 segundos. Após a lavagem do ácido com água abundante e a secagem de 2 segundos com uma *pellet* absorvente, fez-se a aplicação ativa de 2 camadas de adesivo, durante 15 segundos cada. Procedeu-se a nova secagem, desta vez com seringa de ar durante 10 minutos para evaporar o solvente. Obteve-se, então, uma superfície brilhante mas sem movimento, que foi fotopolimerizada durante 10 segundos (*Bluephase*® Style, Unidade de polimerização LED, nº série 1110004706, Ivoclar Vivadent, Liechtenstein). Caso a aparência da superfície após a secagem fosse diferente da mencionada, procedia-se à aplicação de uma nova camada de adesivo antes da fotopolimerização.

Posteriormente, cada incremento de 2 mm de resina composta nanohíbrida (*Tetric EvoCeram*® Bulk Fill, Ivoclar Vivadent, Liechtenstein), foi fotopolimerizado durante 20 segundos sendo o último incremento polimerizado durante 40 segundos.

Todos os espécimes foram armazenados em água destilada por um período de 24 horas, findas as quais foram seccionados em dois fragmentos, recorrendo novamente à máquina de corte Isomet 1000 Precision Saw (nº de série 666-IPS-03518, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) e a um disco de corte impregnado de diamante (Isomet Diamong Wafering Blades, 12,7''x102''x0,3''), a 200 rpm. Uma das metades destinou-se à observação em microscopia eletrónica da sua interface adesiva. A restante metade foi novamente seccionada em ambos os sentidos vestibulo-lingual e mesio-distal, com o intuito de se obter palitos de dentina com resina aderida, possuindo cerca de 1 mm², para serem submetidos a testes de resistência adesiva à microtração. No caso do Grupo A, cada palito foi observado e identificado como fazendo parte (caso exibisse pigmentação) ou não da lesão de cárie.

3.5. Ensaio de resistência adesiva à microtração

Apenas os palitos identificados como parte integrante das lesões de cárie, no Grupo A, foram submetidos ao ensaio de resistência adesiva. Já no Grupo B, foram testados todos os palitos obtidos.

Cada um deles foi aderido com cianoacrilato (*Permabond*[®] 737 black magic toughened adhesive, Permabond, UK) a um *jig* de *Geraldeli* de aço inoxidável e sujeito a forças de tração na máquina de Teste Universal (4500, Instron, Grove City, PA, EUA), com uma célula de carga de 1 kN, a uma velocidade de 1 mm/minuto, até ocorrer fratura.

Os valores de μ TBS, expressidos em MPa, foram calculados pelo programa Series IX (Series IX, Automated materials test system, versão 8.34.00, n° série 21744H, Instron Corporation, Grove City, PA, EUA), através da razão entre a carga efetuada no momento da fratura e a área de adesão.

O modo de falha de cada espécime foi observada ao microscópio ótico (Nikon[®], Japão) a uma ampliação de 10x, tendo sido catalogada como uma das seguintes:

- Adesiva (A): quando ocorreu falha na interface adesiva;
- Coesiva de compósito (CC): quando ocorreu falha na resina composta;
- Coesiva de dentina (CD): quando ocorreu falha na dentina;
- Mista (M): quando ocorreu falha na interface adesiva e envolve várias estruturas.

3.6. Caracterização morfológica da interface adesiva com microscopia eletrônica de varrimento (MEV)

Para a observação em microscopia eletrônica de varrimento (MEV) foram selecionados 3 espécimes de cada grupo A e B, sendo todos eles preparados para observação de acordo com o protocolo descrito por Oliveira em 2004 (Oliveira, 2004). Estes foram submersos em glutaraldeído 2,5 % e paraformol 2 % durante 24 horas, a uma temperatura de 4 °C, e consequentemente submetidos a três banhos sucessivos, de 20 minutos cada, de cacodilato de sódio 0,1M.

A superfície da interface adesiva foi polida com lixas Silicon-Carbide (Ref. 30-5218, Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) de abrasividade decrescente, sendo utilizado cada um dos grãos 120, 400, 500, 1000 e 2500 sucessivamente, durante 30 segundos cada, e intercalados entre si por uma lavagem com água destilada e banho ultrassônico (Branson®Sonic Bath, modelo M2800-E, número de série BHS021631000B, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, EUA) de 60 segundos em etanol a 96 %.

De seguida, fez-se um novo polimento, desta vez em panos de feltro e com suspensões de diamante (*Meta Di*® Monocrystalline Diamond Suspension, Buehler, Lake Bluff, EUA) de grãos 6 µm, 3 µm e 1 µm sucessivamente, durante 60 segundos cada, sendo também intercalados entre si por uma lavagem com água destilada e banho ultrassônico igual ao anteriormente descrito.

Com o objetivo de expor a camada híbrida, os espécimes foram colocados em ácido hidrocloreídrico 0,1 M durante 90 segundos, sendo de seguida lavados com água destilada durante 30 segundos. Seguidamente, foram mergulhados em hipoclorito de sódio a 10 % durante 60 segundos. Por fim, foram lavados novamente com água destilada durante 30 segundos e colocados num banho de ultrassons com água destilada durante 60 segundos.

A desidratação dos espécimes foi feita através de banhos com concentrações crescentes de etanol: 25 % durante 1 minuto, 50 % durante 20 minutos, 75 % durante 20 minutos, 96 % durante 30 minutos e 100 % durante 60 minutos. Para finalizar, fez-se a sua submersão em hexametildisilazano (Ref.: 440191-1L; Sigma Aldrich) durante 10 minutos, sendo os espécimes deixados a secar sobre um papel de feltro (Whitefelt; Ref.162002; Buehler, Lake Bluff, IL, EUA), à temperatura ambiente, durante 12 horas, com a interface adesiva virada para cima.

Por fim, os espécimes foram colados em discos de alumínio com fita de carbono de dupla face (NEM TAPE, Nisshin Em.Co, Ltd., Japão) e processados numa metalizadora com atmosfera de argon e 200 nm de ouro/paládio, (JEOL Fine Coat Ion Sputter JFC-1100E, n.º série SM333132-670, Tóquio, Japão).

Foram realizadas as observações ao microscópio eletrónico de varrimento (MEV) (Hitachi S-450, n.º série 5333884, Tóquio, Japão) com eletrões secundários, a 20 kV, sendo captadas microfotografias da interface adesiva com ampliações de 200 x,

Estudo *in vitro* da resistência adesiva à dentina cariada e análise morfológica da interface

1000 x e 2000 x em todos os espécimes, sendo que em espécimes que apresentavam uma interface muito heterogênea, foram feitas microfotografias com outras ampliações. As imagens foram obtidas com o *software* Esprit 1.8.2.2167 (Bruker, MA, EUA).

3.7. Análise estatística

Para a realização da análise estatística dos valores de microtração foi realizado o cálculo da média dos valores de microtração e o desvio-padrão para cada grupo com recurso ao programa SPSS (*Statistic Package for Social Sciences*; IBM SPSS statistics, version 24.0).

De forma a avaliar a normalidade da distribuição e a homogeneidade das variâncias utilizaram-se os testes de *Shapiro-Wilk* e *Levene*, respetivamente.

A normalidade e homogeneidade não foram garantidas. Assim, foi utilizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para comparar os grupos experimentais. O nível de significância estatística foi fixado em 5 %.

4. Resultados

4.1. Análise dos valores de microtração

No presente trabalho laboratorial foram obtidos entre 3 a 10 palitos por dente.

Grupos Experimentais	Valores de Microtração			
	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo
<u>Grupo A</u> – All-Bond Universal ER com pressão pulpar em dentina cariada	30,7 ^a	11,3	12,4	63,6
<u>Grupo B</u> – All-Bond Universal ER com pressão pulpar em dentina hígida	50,3 ^b	23,1	21,3	107,1

Tabela 2. Valores de média, desvio padrão, mínimo e máximo de resistência adesiva à microtração, em MPa, por grupo experimental. Letras em *superscript* diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Os valores de microtração obtidos e evidenciados na Tabela 2 foram comparados através do teste de Mann-Whitney, uma vez que não se mantiveram os pressupostos de normalidade e homogeneidade (as tabelas de análise estatística encontram-se no Apêndice A).

Verificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre os 2 grupos testados ($p < 0,05$). Os espécimes do Grupo A resultaram em valores de resistência adesiva mais elevados do que os espécimes do Grupo B.

A percentagem do modo de falha após microtração está representado no gráfico da Figura 2. No Grupo A, a maior percentagem de falha corresponde ao modo misto (M). Já no Grupo B, observou-se uma maior percentagem de falhas coesivas de compósito (CC), sendo estas pouco mais elevadas que as falhas mistas neste mesmo grupo.

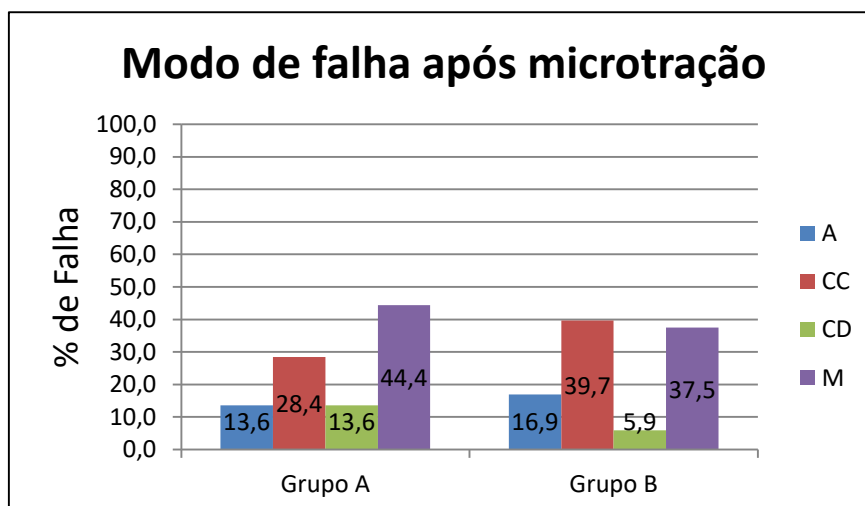


Figura 2. Gráfico demonstrativo do modo de falha de cada grupo estudado, em percentagem. A – Falha Adesiva; CC- Falha Coesiva de Compósito; CD – Falha Coesiva de Dentina; M – Falha Mista.

4.2. Caracterização morfológica da interface adesiva em MEV

Em relação ao Grupo A (dentina cariada com aplicação de adesivo em modo *etch&rinse*, sujeita a pressão pulpar), o primeiro e o terceiro espécimes apresentam uma fina camada híbrida com prolongamentos de resina abundantes que penetram nos túbulos dentinários, possuindo um menor comprimento no segundo caso apresentado, mas possuindo prolongamentos acessórios.

O segundo espécime deste grupo não exhibe a formação de uma camada híbrida, estendendo-se os curtos prolongamentos de resina na fenda existente entre o material restaurador e a dentina cariada.

No primeiro espécime do Grupo B (dentina hígida com aplicação de adesivo em modo *etch&rinse*, sujeita a pressão pulpar), observa-se a falha do estabelecimento de uma camada híbrida com prolongamentos que penetrem nos túbulos dentinários, existindo uma fenda entre o material restaurador e a dentina saudável.

Nos segundo e terceiro espécimes deste mesmo grupo, deteta-se a existência de uma camada híbrida espessa, com prolongamentos de resina mais longos que os do Grupo A, abundantes e em forma de funil, com prolongamentos acessórios.

Estudo *in vitro* da resistência adesiva à dentina cariada e análise morfológica da interface

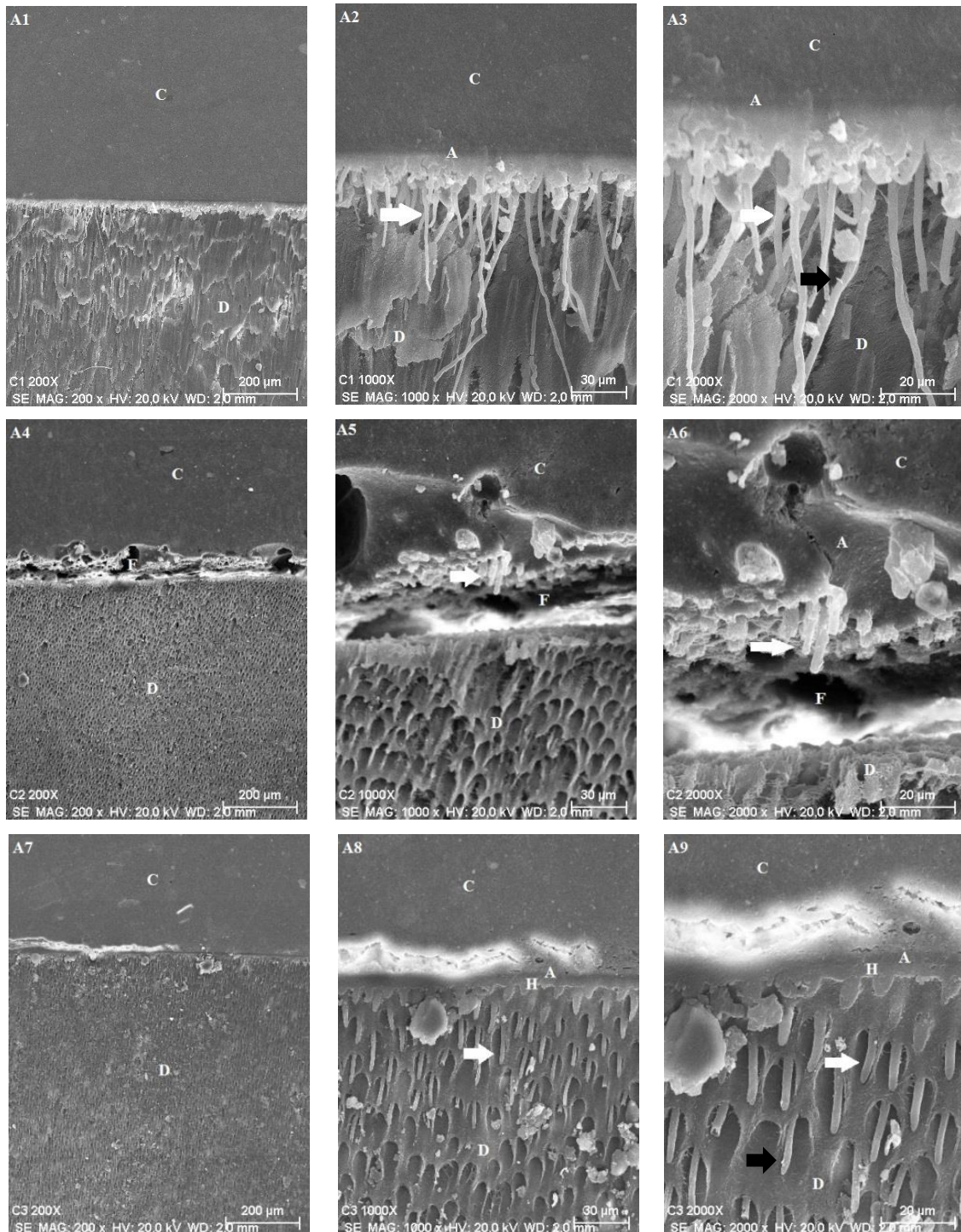


Figura 3. Imagens obtidas através de MEV da interface adesiva após aplicação do adesivo no modo *etch&rinse*, submetido a pressão pulpar positiva, em dentina cariada – Grupo A (A). Imagens A1, A4 e A7 – ampliação 200 x; Imagens A2, A5 e A8 – ampliação 1000 x; Imagens A3, A6 e A9 – ampliação 2000 x. C – Compósito. A – Adesivo. H – Camada Híbrida. F – Falha. D – Dentina. Seta branca – Prolongamentos de resina. Seta preta – prolongamentos acessórios.

Estudo *in vitro* da resistência adesiva à dentina cariada e análise morfológica da interface

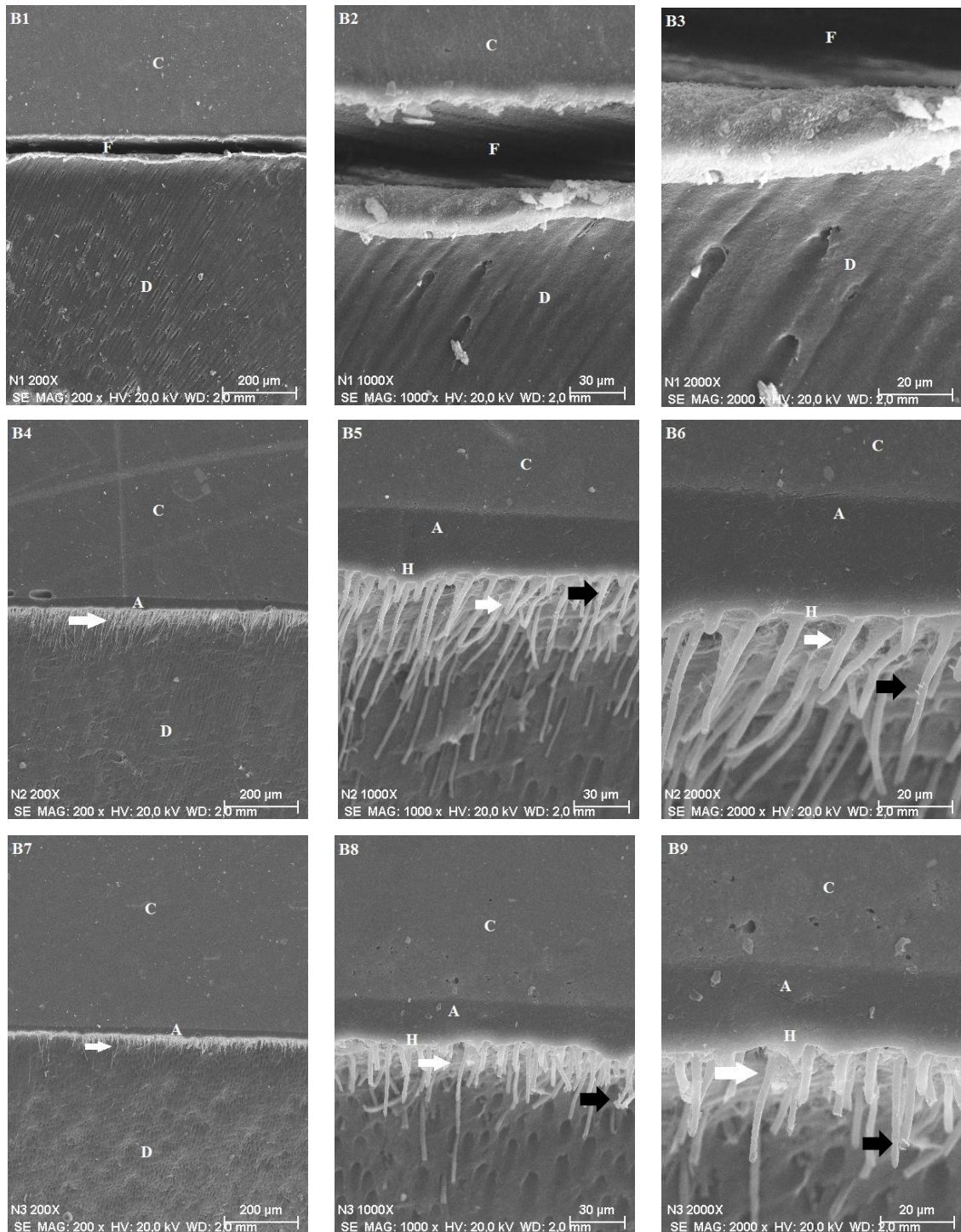


Figura 4. Imagens obtidas através de MEV da interface adesiva após aplicação do adesivo no modo *etch&rinse*, submetido a pressão pulpar positiva, em dentina hígida – Grupo B (B). Imagens B1, B4 e B7 – ampliação 200 x; Imagens B2, B5 e B8 – ampliação 1000 x; Imagens B3, B6 e B9 – ampliação 2000 x. C – Compósito. A – Adesivo. H – Camada Híbrida. F – Falha. D – Dentina. Seta branca – Prolongamentos de resina. Seta preta – prolongamentos acessórios.

5. Discussão

Neste ensaio laboratorial, pretendemos identificar as diferenças na resistência adesiva e ultra morfologia da camada híbrida promovida por um sistema adesivo universal em dentina cariada e em dentina saudável, sob o efeito de uma pressão pulpar positiva. Para este efeito, foram incluídos no estudo dentes possuindo lesões de cárie que envolvessem dentina, sem envolvimento pulpar.

Segundo os mais recentes conhecimentos na área da dentisteria minimamente invasiva, aquando da remoção de uma lesão de cárie, devemos eliminar somente dentina infetada (que se encontra na zona mais superficial da lesão), preservando o mais possível a parte deste tecido que se encontra apenas afetado (mais profunda) (Mount *et al.*, 2003; Tyas *et al.*, 2000). Esta afirmação baseia-se no facto de que o material bacteriano se encontra exclusivamente na camada infetada (Kidd *et al.*, 1993; Ricketts *et al.*, 1995 e 2001), sendo a remoção desta o estímulo suficiente para suspender a progressão da lesão (Ranly *et al.*, 2000; Mertz-Fairhurst *et al.*, 1998; Atac *et al.*, 2001).

Também o facto do colagénio intacto presente na dentina afetada ser capaz de ser remineralizado apoia, de um ponto de vista biológico e terapêutico, a inutilidade da remoção desta camada de dentina (Meller *et al.*, 2007). Por fim, a dentina afetada promove uma selagem natural da cavidade, sendo responsável por uma menor sensibilidade pós-operatória e durante o tratamento, devendo ser preservada ao máximo (Banomyong *et al.*, 2009).

O método de deteção de dentina infetada pode enviesar os resultados de um estudo *in vitro*, no entanto não foi possível criar um método de deteção mais padronizado e fiável. Por outro lado, os parâmetros utilizados para esta identificação foram os mesmos que se aplicariam aquando da remoção de uma lesão de cárie no ato clínico, sendo estes a escassez de dureza, a coloração escura, a falta de brilho e a quantidade de humidade presente (Neves *et al.*, 2011; Toledano *et al.*, 2013). Deste modo, o estudo aproxima-se das condições reais de que o médico dentista dispõe no seu quotidiano de trabalho, para que lhe seja possível identificar e remover adequadamente dentina infetada (Kidd *et al.*, 1993).

Apesar da falta de padronização dos critérios de remoção de cárie, sabe-se que os tecidos dentários cariados começam primeiramente por perder a sua dureza,

seguindo-se a sua descoloração, e apenas em último lugar surge a invasão microbiana (Seltzer, 1941). Deste modo, a remoção de todo o tecido amolecido e pigmentado garante a eliminação também das bactérias presentes causadoras de lesão (Fusayama *et al.*, 1966).

O recurso a reveladores de tecido cariado, passíveis também de uso clínico, poderia ter sido considerado neste estudo. A sua utilização acabou por não se concretizar pois tem vindo a ser demonstrado que estas substâncias selecionam tecido desmineralizado mas também tecido ainda passível de remineralização, e não propriamente o tecido infetado por bactérias que se procura (Kidd *et al.*, 1993; Yip *et al.*, 1994; Ansari *et al.*, 1999; Banerjee *et al.*, 2003), culminando na remoção de dentina para além daquela que é estritamente necessária (McComb, 2000; Banerjee *et al.*, 2003).

Apesar de todos os parâmetros definidos para uma correta remoção de uma lesão de cárie, a eliminação também de tecido saudável é inevitável, desde logo porque o formato destas lesões é cónico e a sua profundidade irregular, culminando na exposição iatrogénica de dentina saudável (Banomyong *et al.*, 2009), podendo levar a respostas pulpares ao tratamento mais exacerbadas do que seria expectável (Pashley *et al.*, 1991).

O facto de haver permeabilidade dentária leva a que, quando a dentina é sujeita a um estímulo, como o desenvolvimento de uma lesão de cárie ou a sua própria remoção, a quantidade de água na sua superfície aumente, influenciando a qualidade de interface adesiva, podendo levar até a uma redução da força adesiva (Pashley *et al.*, 1997). Tendo em conta a interação pulpodentinária que se sabe que existe num dente vital, e ainda com o intuito de aproximar o mais possível as condições laboratoriais deste estudo às condições clínicas naturalmente existentes, recorreu-se ao uso de um aparelho simulador de pressão pulpar semelhante ao de Sauro *et al.* de 2007, selecionando o valor de 77cmH₂O, descrito no estudo laboratorial de Brown e Yankowitz em 1964. Este sistema já foi vastamente testado e utilizado em estudos do mesmo género (Ciucchi *et al.*, 1995; Grégoire *et al.*, 2003; Chersoni *et al.*, 2004; Cadenaro *et al.*, 2005; Rosales-leal *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2015), demonstrando a sua necessidade de utilização, bem como a reprodutibilidade das suas medições (Elgalaid *et al.*, 2007).

A utilização de sistemas simuladores de pressão pulpar em estudos comparando dentina saudável e dentina cariada foi aplicada já em anteriormente (Banomyong *et al.*,

2009; Elgalaid *et al.*, 2007; Hamid & Hume, 1997; Pashley *et al.*, 1991), residindo a justificação da sua aplicabilidade na intenção de eliminar possíveis discrepâncias que possam surgir entre as condições laboratoriais e as condições *in vivo*. No entanto, a criação de uma pressão pulpar simulada em dentina cariada pode revelar-se irrelevante, uma vez que a permeabilidade deste tipo de substrato pode estar, muitas vezes, comprometida pela existência de dentina terciária, um tecido que tem vindo a apresentar uma permeabilidade menor do que a dentina secundária hígida (Pashley *et al.*, 1991).

Numa outra perspetiva, observou-se no estudo de Hamid e Hume de 1997 que a dentina remanescente em dentes possuindo lesões de cárie de grandes dimensões era, curiosamente, mais permeável do que a dentina remanescente dos dentes com lesões de cárie de dimensões moderadas e menores (Hamid *et al.*, 1997). Este facto pode dever-se às diferenças do tempo de progressão da lesão cariosa, o que é obviamente muito difícil de padronizar quando se utilizam cáries naturais. Tendo em conta a evidência existente, outros estudos deverão ser feitos com o intuito de comparar tecido cariado e tecido saudável em situações de existência ou não de pressão pulpar.

Relativamente aos parâmetros estudados neste ensaio laboratorial, observamos que a interface de adesão em dentina saudável revelou valores de resistência adesiva à microtração superiores comparativamente aos valores em dentina cariada, sendo esta diferença estatisticamente significativa. Do mesmo modo, as imagens obtidas através da microscopia eletrónica de varrimento também são díspares entre os grupos testados. Estes resultados assemelham-se aos de Yoshiyama *et al.* em 2000 e Nakajima *et al.* em 1995, onde também é testada e comparada a resistência adesiva a substratos dentinários cariados e hígidos.

Apesar destes resultados temos de ter em atenção ao facto de no Grupo A, os palitos submetidos à microtração terem sido somente os que possuíam lesões de cárie detetáveis, correspondendo também à porção mais central da coroa dos dentes, pois eram provenientes de lesões oclusais únicas. Os valores de resistência adesiva à microtração destes espécimes podem ter-se revelado menores não especificamente por terem a lesão cariosa, mas porque o diâmetro dos túbulos dentinários nesta porção do dente é superior, sendo a sua permeabilidade mais elevada (Ghazali, 2003), como demonstrado pelo estudo de Richardson *et al.* em 1991, onde se conclui que a permeabilidade dentinária aumenta à medida que a superfície dentinária se aproxima da

polpa (Richardson *et al.*, 1991). Os valores podem também estar relacionados com a existência de maior quantidade de dentina central neste Grupo tendo esta zona necessariamente menos dentina intertubular. Segundo Perdigão, em 2010, numa mesma lesão de cárie, os módulos de dureza de dentina central e periférica são semelhantes entre si, mas são significativamente diferentes em relação ao módulo de dureza da dentina intertubular, sendo esta mais resistente quando submetida a forças mecânicas, e estabelecendo-se uma correlação entre dureza do tipo de dentina e força adesiva local (Perdigão, 2010).

Nas imagens obtidas em MEV, observa-se uma camada híbrida de menores dimensões na dentina cariada. Este facto pode dever-se à existência de um tecido menos estruturado, o que pode culminar numa menor impregnação deste por parte do adesivo (Hamid & Hume, 1997). Sabe-se, também, que na base das lesões de cárie existe dentina terciária, com uma maior percentagem de material mineral/inorgânico, o que pode levar a uma maior resistência ao condicionamento ácido, enfraquecendo a adesão (Mjör, 2009) e tornando a camada híbrida menos espessa, indetetável até, como se observa nas imagens A2 e A3 da Figura 3.

Observando os resultados deste estudo *in vitro*, é possível, então, rejeitar a hipótese nula proposta no objetivo específico.

Contudo, os valores da resistência adesiva à microtração dos espécimes do Grupo A, constituído por dentes com lesões de cárie em dentina, são considerados bons, pois valores de resistência adesiva superiores a 20 MPa dão origem a restaurações em resina composta bem-sucedidas (Burrow *et al.*, 1994, Isolan *et al.*, 2018), como é o caso.

Em relação aos modos de falha após microtração dos espécimes, foram encontradas mais falhas de natureza mista no Grupo A, e mais falhas coesivas no compósito no Grupo B. O facto de o modo de falha no Grupo A estar mais relacionado com a interface adesiva já era expectável, uma vez que se trata de tecido cariado, necessariamente mais frágil e menos impregnado por resina (Çehreli *et al.*, 2002) do que o tecido dentinário hígido. As falhas coesivas em compósito apesar de não refletirem diretamente as forças de resistência adesiva na superfície de adesão, são uma indicação de que a resistência adesiva será pelo menos a que foi detetada.

Ainda com vista a aproximar este estudo à realidade clínica, foi criada uma *smear-layer* que se comparasse à formada pelo uso de brocas aquando da remoção das lesões de cárie, através da utilização de uma lixa de grão 400 na superfície das amostras, durante 2 minutos (Oliveira *et al.*, 2003).

Adicionalmente, optou-se pela aplicação do sistema adesivo no modo *etch&rinse*, com o intuito de remover toda a *smear-layer* e promover, assim, uma melhor adesão (Isolan *et al.*, 2018). Porém, em outros estudos já publicados, como o de Nakajima *et al.* em 1999, a aplicação de adesivos em dentina cariada no modo *self-etch* tem-se revelado vitoriosa, dando origem até a valores de resistência adesiva superiores em dentina cariada do que em dentina hígida (Nakajima *et al.*, 1999). Também o estudo de Nakajima *et al.* de 1999 refere que a *smear-layer* proveniente de dentina cariada parece ser mais porosa, o que culmina numa mais fácil penetração de *primers* auto condicionantes no substrato cariado do que em dentina saudável (Nakajima *et al.*, 1999).

Futuros trabalhos de investigação nesta linha de pensamento devem, então, enveredar pela utilização também de adesivos universais no modo *self-etch*, verificando eventuais diferenças em termos de resistência adesiva à microtração e à morfologia da interface adesiva. Também seria interessante observar como se comportam espécimes envelhecidos sujeitos aos mesmos procedimentos descritos no presente estudo, assim como realizar alterações ao nível do protocolo de aplicação do adesivo, investigando se cada uma delas teria interferência no desfecho final.

6. Conclusão

De acordo com os resultados deste estudo *in vitro* e apesar das suas limitações, pode-se concluir que:

A aplicação do sistema adesivo universal *All-Bond Universal*[®] no modo *etch&rinse*, sujeito a pressão pulpar, levou a valores de resistência adesiva à microtração superiores em dentina saudável do que em dentina cariada.

Apesar de se terem verificado diferenças estatisticamente significativas entre cada um dos substratos, os valores registados em dentina cariada foram também aceitáveis, revelando uma certa qualidade da interface adesiva.

São visíveis diferenças morfológicas na interface adesiva entre cada um dos grupos, havendo uma correlação entre estas e os valores de resistência adesiva à microtração após 24 h.

No entanto, não se pode dizer que existe relação direta entre a probabilidade de falha do sistema adesivo e o substrato em que este é aplicado.

São necessários efetuar mais estudos para apurar se, de facto, o sistema adesivo em causa produz uma adesão de pior qualidade em dentina cariada do que a dentina saudável, variando alguns parâmetros como, por exemplo, aumentar o tempo do condicionamento ácido, utilizando também o modo de aplicação *self-etch*, e recorrendo ao envelhecimento dos espécimes.

7. Referências Bibliográficas

1. Abreu D. Estudo *in vitro* da adesão à dentina promovida por um sistema universal – All-Bond Universal – com e sem pressão pulpar. Universidade de Lisboa. 2017.
2. Ansari G, Beeley JA, Reid JS, Foye RH. Caries detector dyes – an *in vitro* assessment of some new compounds. J Oral Rehabil. 1999;26:453–458.
3. Armstrong WG. Chemistry of carious enamel and dentin. J Dent Res Supplement. 1964;43(6):1002–06
4. Arrais CAG, Giannini M, Nakajima M, Tagami J. Effects of additional and extended acid etching on bonding to caries-affected dentine. Eur J Oral Sci. 2004;112:458–464.
5. Atac A, Cehreli ZC, Sener B. Antibacterial activity of fifth generation dentin bonding systems. Journal of Endodontics. 2001;27:730–3.
6. Baier RE. Principles of adhesion. Oper Dent. 1992;(5):1–9.
7. Banerjee A, Kidd EAM, Watson T: *In vitro* validation of carious dentine removed using different excavation criteria. Am J Dent. 2003;16:228–230.
8. Banomyong D, Palamara JEA, Messer HH, Burrow MF. Fluid flow after resin-composite restoration in extracted carious teeth. Eur J Oral Sci. 2009;117:334–342.
9. Björndal L, Mjör IA, Odont D. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 4: dental caries – characteristics of lesions and pulpal reactions. Quintessence Int. 2001;32:717–736.
10. Brown AC, Yankowitz D. Tooth Pulp Tissue Pressure and Hydraulic Permeability. Circ Res. 1964;15(1):42–50.
11. Buonocore MG, Matsui A, Gwinnett AJ. Penetration of resin dental materials into enamel surfaces with reference to bonding. Arch Oral Biol. 1968;13(1):61–70.
12. Buonocore MG. A Simple Method of Increasing the Adhesion of Acrylic Filling Materials to Enamel Surfaces. J Dent Res. 1955;34(6):849–53.
13. Burrow MF, Tagami J, Negishi T, Nikaido T, Hosoda H. Early tensile bond strengths of several enamel and dentin bonding systems. J Dent Res. Feb 1994;73(2):522–8.
14. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, *et al.* Degree of conversion and permeability of dental adhesives. Eur J Oral Sci. 2005;113(6):525–30.

15. Çehreli ZC, Yazici AR, Akca T, Özgünaltay G. A morphological and micro-tensile bond strength evaluation of a single-bottle adhesive to caries-affected human dentine after four different caries removal techniques. *Journal of Dentistry*. 2003;31:429–435.
16. Celiberti P, Francescut P, Lussi A. Performance of Four Dentine Excavation Methods in Deciduous Teeth. *Caries Res*. 2006;40:117–123.
17. Chersoni S, Suppa P, Grandini S, Goracci C, Monticelli F, Yiu C, *et al.* In vivo and in vitro permeability of one-step self-etch adhesives. *J Dent Res*. 2004;83(6):459–64.
18. Ciucchi B, Bouillaguet S, Holz J, Pashley D. Dentinal fluid dynamics in human teeth, in vivo. *J Endod*. 1995;21(4):191–4.
19. Daculsi G, LeGeros RZ, Jean A, Kerebel B. Possible physico-chemical processes in human dentin caries. *J Dent Res*. 1987;66:1356–1359.
20. Delvan G. Sistemas Adesivos Dentinários. Associação Brasileira de Odontologia – Escola de Aperfeiçoamento Profissional. Florianópolis. Nov 2001.
21. Elgalaid TO, Creanor SL, Creanor S, Hall AF. The permeability of natural dentine caries before and after restoration: An in vitro study. *Journal of Dentistry*. 2007;35:656–663.
22. Fujita K, Ma S, Aida M, Maeda T, Ikemi T, Hirata M, Nishiyama N. Effect of reacted acidic monomer with calcium on bonding performance. *J Dent Res*. 2011;90:607–612.
23. Fusayama T. Two layers of carious dentin: diagnosis and treatment. *Oper Dent*. 1979;4:63–70.
24. Fusayama T, Okuse K, Hosoda H. Relationship between Hardness, Discoloration, and Microbial Invasion in Carious Dentin. *J dent Res*. Jul-Aug 1966;45(4):1033–46.
25. Ghazali F. Permeability of Dentine. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. Jan 2003;10(1):27–36.
26. Grégoire G, Joniot S, Guignes P, Millas A. Dentin permeability: Self-etching and one-bottle dentin bonding systems. *J Prosthet Dent*. 2003;90(1):42–9.
27. Hamid A, Hume WR. Diffusion of resin monomers through human carious dentin *in vitro*. *Endod Dent Traumatol*. 1997;13:1–5.
28. Hashimoto M, Whitesides GM. Flowing lattices of bubbles as tunable, self-assembled diffraction gratings. *Small*. Nov 2006;2(11):1292–8.

29. Isolan CP, Onofre RS, Lima GS, Moraes RR. Bonding to Sound and Caries-Affected Dentin: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Adhes Dent*. 2018;20:7–18.
30. Kanca J. Effect of resin primer solvents and surface wetness on resin composite bond strength to dentin. *Am J Dent*. 1992;5(4):213–215.
31. Kidd EAM, Joyston-Bechal S. *Essentials of Dental Caries; The Disease and its Management*. Bristol Wright. 1987.
32. Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D. Microbiological validation of assessments of caries activity during cavity preparation. *Caries Research*. 1993;27:402–8.
33. Kuboki Y, Ohgushi K, Fusayama T. Collagen biochemistry of the two layers of carious dentin. *J Dent Res*. 1977;56:1233–7.
34. Marshall GW, Habelitz S, Gallagher R, Balooch M, Balooch G, Marshall SJ. Nanomechanical properties of hydrated carious human dentin. *J Dent Res*. 2001;80:1768-1771.
35. Meller C, Welk A, Zeligowski T, Splieth C. Comparison of dentin caries excavation with polymer and conventional tungsten carbide burs. *Quintessence International*. 2007;38:565–9.
36. Mertz-Fairhurst EJ, Curtic JW, Ergle JW, *et al*. Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: results at year 10. *Journal of the American Dental Association*. 1998;129:55–66.
37. Miller WA, Massler M. Permeability and staining of active and arrested lesions in dentin. *Br Dent J*. 1962;112:187– 97.
38. Mjör IA. Dentin Permeability: The Basis for Understanding Pulp Reactions and Adhesive Technology. *Braz Dent J*. 2009;20(1):3–16.
39. Mount GJ. Minimal intervention dentistry: rationale of cavity design. *Operative Dentistry*. 2003;28:92–9.
40. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res*. 1982;16(3):265–73.
41. Nakabayashi N, Takarada K. Effect of HEMA on bonding to dentin. *Dent Mater*. 1992;8(2):125–30.

42. Nakajima M, Kitasako Y, Okuda M, Foxton RM, Tagami J. Elemental distributions and microtensile bond strength of the adhesive interface to normal and caries-affected dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;72:268–275.
43. Nakajima M, Ogata M, Okuda M, Tagami J, Sano H, Pashley DH. Bonding to caries-affected dentin using self-etching primers. *American Journal of Dentistry*; Dec 1999;12(6):309–314.
44. Nakajima M, Sano H, Burrow MF, Tagami J, Yoshiyama M, Ebisu S, Ciucchi B, Russell CM, Pashley DH. Tensile bond strength and SEM evaluation of caries-affected dentin using dentin adhesives. *J Dent Res*. 1995;74:1679–1688.
45. Neves AA, Coutinho E, De Munck J, Van Meerbeek B. Caries removal effectiveness and minimal-invasiveness potential of caries-excitation techniques: a micro-CT investigation. *Journal of Dentistry*. 2011;39:154–62.
46. Nikaido T, Kunzelmann KH, Ogata M, Harada N, Yamaguchi S, Cox CF, Hickel R, Tagami J. The in vitro dentin bond strengths of two adhesive systems in class I cavities of human molars. *J Adhes Dent*. 2002;4:31-39.
47. Ogawa K, Yamashita Y, Ichijo T, Fusayama T. The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentin. *J Dent Res*. 1983;62:7–10.
48. Ohgushi K, Fusayama T. Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. *J Dent Rest*. 1975;54:1019–26.
49. Oliveira SMSA. Mecanismos de adesão: análise de *Self-Etching Materials*. Universidade do Porto. 2004.
50. Oliveira SSA, Pugach MK, Hilton JF, Watanabe LG, Marshall SJ, Marshall GW. The influence of the dentin smear layer on adhesion: a self-etching primer vs. a total-etch system. *Dent Mater*. 2003;19(8):758–67.
51. Pashley DH, Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent*. 1997;25(5):355–72.
52. Pashley EL, Talman R, Horner JA, Pashley DH. Permeability of normal versus carious dentin. *Endod Dent Traumatol*. 1991;7:207–211.
53. Pashley DH. Dynamics of the pulp-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996;7(2):104–33.
54. Pashley DH. The effects of acid etching on the pulp dentin complex. *Oper Dent*. 1992;17(6):229–42.

55. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjaderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, Tezvergil-Mutluay A. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater.* 2011;27:1–16.
56. Perdigão J, Kose C, Mena-Serrano AP, De Paula EA, Tay LY, Reis A. *et al.* A New Universal Simplified Adhesive: 18-Month Clinical Evaluation. *Oper Dent.* 2014;39(2):113–27.
57. Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: A comprehensive review. *J Esthet Restor Dent.* 2013;25(4):219–41.
58. Perdigão J, Swift EJ. Universal Adhesives. *J Esthet Restor Dent.* 2015;27(6):331–4.
59. Perdigão J. Dentin bonding as a function of dentin structure. *Dent Clin North Am.* 2002;46(2):277–301.
60. Perdigão J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater.* 2010;26(2):24–37.
61. Perdigão J. New Developments in Dental Adhesion New Developments in Dental Adhesion. *Dent Clin North Am.* 2007;51(2):333–57.
62. Ranly DM, Garcia-Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. *Journal of Dentistry.* 2000;28:153–61.
63. Reeder OW, Walton RE, Livingston MJ, Pashley DH. Dentin Permeability: Determinants of Hydraulic Conductance. *J Dent Res.* 1978;57(2):187–93.
64. Richardson D, Tao L, Pashley D. Dentin Permeability: Effects on Crown Preparation. *The International Journal of Prosthodontics.* 1991;4(3):219–225.
65. Ricketts DNJ, Kidd EAM, Beighton D. Operative and microbiological validation visual, radiographic and electronic diagnosis of occlusal caries in non-cavitated teeth judged to be in need of operative care. *British Dental Journal.* 1995;179:214–20.
66. Ricketts D. Management of the deep carious lesion and the vital pulp dentine complex. *British Dental Journal.* 2001;191:606–10.
67. Rodrigues S, Oliveira N, Chasqueira F, Portugal J, Oliveira SSA. Permeabilidade dentinária e morfologia da interface adesiva de diferentes sistemas adesivos. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.* 2015;56(1):42–50.
68. Rosales-Leal JJ, de la Torre-Moreno FJ, Bravo M. Effect of pulp pressure on the micropermeability and sealing ability of etch & rinse and self-etching adhesives. *Oper Dent.* 2007;32(3):242–50.

69. Sauro S, Pashley DH, Montanari M, Chersoni S, Carvalho RM, Toledano M, et al. Effect of simulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives. *Dent Mater*. 2007;23(6):705–13.
70. Schulze KA, Oliveira SA, Wilson RS, Gansky SA, Marshall GW, Marshall SJ. Effect of hydration variability on hybrid layer properties of a self-etching versus an acid-etching system. *Biomaterials*. 2005;26(9):1011–8.
71. Seltzer, S. The Comparative Value of Various Medicaments in Cavity Sterilization. *J Amer dent*. 1941;28:1844–52.
72. Sezinando A. Looking for the ideal adhesive - A review. *Rev Port Estomatol Med Dent e Cir Maxilofac*. 2014;55(4):194–206.
73. Tagami J, Hosoda H, Burrow MF, Nakajima M. Effect of aging and caries on dentin permeability. *Proc Finn Dent Soc*. 1992;88(1):149–154.
74. Tay FR, Pashley DH. Water treeing--a potential mechanism for degradation of dentin adhesives. *Am J Dent*. 2003;16(1):6–12.
75. Toledano M, Ghinea R, Cardona J, Cabello I, Yamauti M, Pérez MM, Osorio R. Digital image analysis method to assess the performance of conventional and self-limiting concepts in dentine caries removal. *Journal of Dentistry*. 2013;4:31–38.
76. Tyas MJ, Anusavice KJ, Frencken JE, Mount GJ. Minimal intervention dentistry – a review. FDI Commission Project 1- 97. *International Dental Journal*. 2000;50:1–12.
77. Van Hassel H. Physiology of the human dental pulp. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol*. 1971;32(1):126–34.
78. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*. 2007;28(26):3757–85.
79. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent* 2003;28(3):215–35.
80. Von Der Fehr FR, Loe H, Thelade E. Experimental caries in man. *Caries Res*. 1970;4:131–48.
81. Yip HK, Stevenson AG, Beeley JA: The specificity of caries detector dyes in cavity preparation. *Br Dent J*. 1994;176:417–421.

82. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, *et al.* Comparative study on adhesive performance of functional monomers. 2004;83(6):454–8.
83. Yoshida Y, Yoshihara K, Nagaoka N, Hayakawa S, Torii Y, Ogawa T, *et al.* Self-assembled Nano-layering at the Adhesive Interface. J Dent Res. 2012; 91(4):376-81.
84. Yoshihara K, Yoshida Y, Nagaoka N, Hayakawa S, Okihara T, De Munck J, *et al.* Adhesive interfacial interaction affected by different carbon-chain monomers. Dent Mater. 2013;29(8):888–97.
85. Yoshiyama M, Urayama A, Kimochi T, Matsuo T, Pashley DH. Comparison of conventional vs self-etching adhesive bonds to caries-affected dentin. Oper Dent. 2000;25:163–169.

Estudo *in vitro* da resistência adesiva à dentina cariada e análise morfológica da interface

Apêndice A – Tabelas


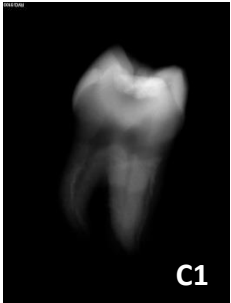

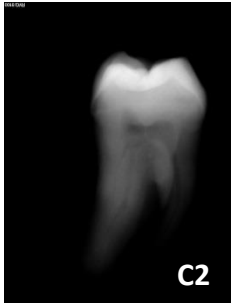

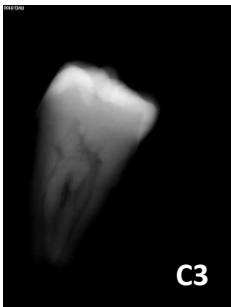

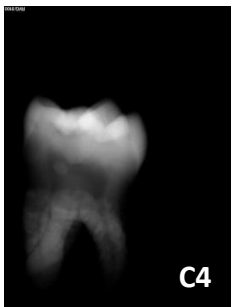


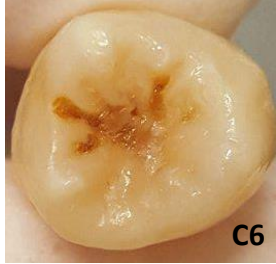


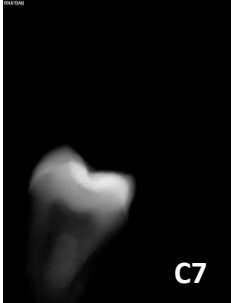
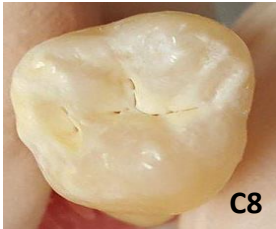
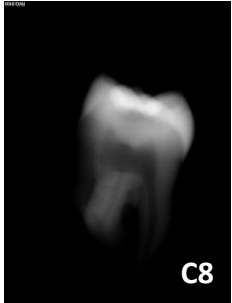
Fotografias	Radiografias	Fotografias	Radiografias
 C1	 C1	 C2	 C2
 C3	 C3	 C4	 C4
 C5	 C5	 C6	 C6
 C7	 C7	 C8	 C8

Tabela A.1. Fotografias da face oclusal e radiografias periapicais dos espécimes cariados numerado de 1 a 8.

Estudo *in vitro* da resistência adesiva à dentina cariada e análise morfológica da interface

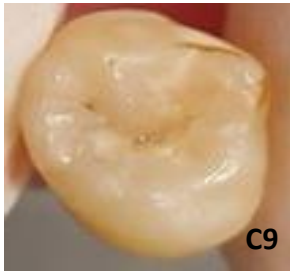
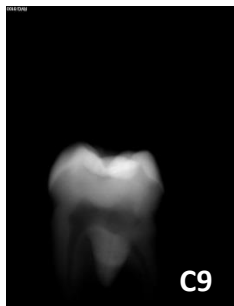

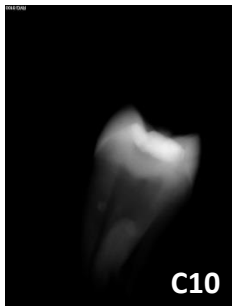

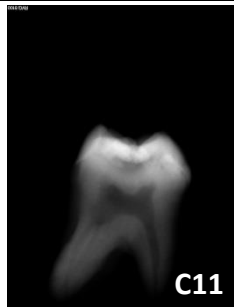

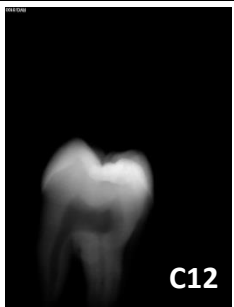

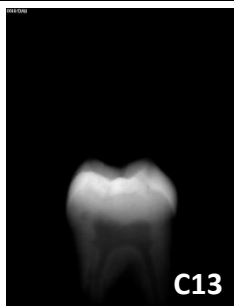

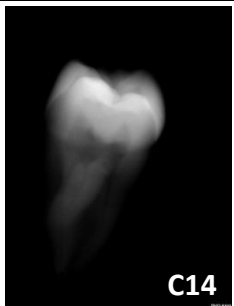

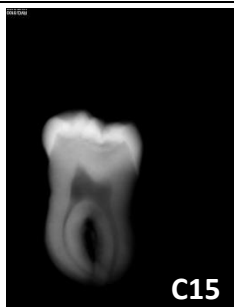

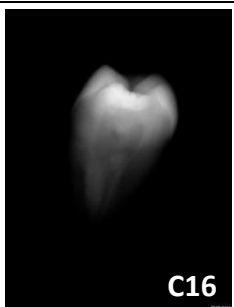
Fotografias	Radiografias	Fotografias	Radiografias
 C9	 C9	 C10	 C10
 C11	 C11	 C12	 C12
 C13	 C13	 C14	 C14
 C15	 C15	 C16	 C16

Tabela A.2. Fotografias da face oclusal e radiografias periapicais dos espécimes cariados numerado de 9 a 16.

Estudo *in vitro* da resistência adesiva à dentina cariada e análise morfológica da interface

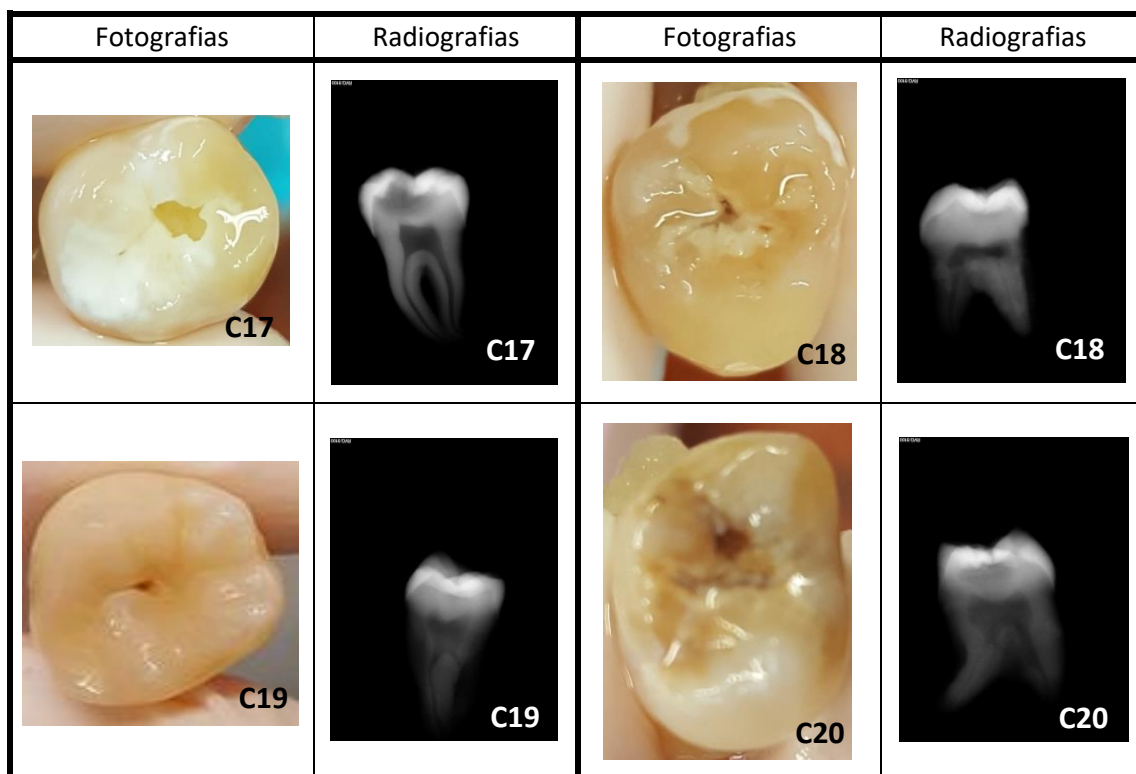


Tabela A.3. Fotografias da face oclusal e radiografias periapicais dos espécimes cariados numerado de 17 a 20.

Tests of Normality							
Grupo		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
VAR00001	tecido cariado	,231	20	,007	,861	20	,008
	tecido saudável	,231	20	,007	,830	20	,002

a. Lilliefors Significance Correction

Tabela A. 4. Testes de *Shapiro-Wilk* para avaliação da normalidade da distribuição de valores

Test of Homogeneity of Variance

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
VAR00001	Based on Mean	6,161	1	38	,018
	Based on Median	3,710	1	38	,062
	Based on Median and with adjusted df	3,710	1	27,683	,064
	Based on trimmed mean	5,106	1	38	,030

Tabela A. 5. Testes de *Levene* para avaliação de homogeneidade da variância

Mann-Whitney Test

Ranks

	Grupo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
VAR00001	tecido cariado	20	13,90	278,00
	tecido saudável	20	27,10	542,00
	Total	40		

Test Statistics^a

	VAR00001
Mann-Whitney U	68,000
Wilcoxon W	278,000
Z	-3,571
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^b

a. Grouping Variable: Grupo

b. Not corrected for ties.

Tabela A. 6. Testes de *Mann-Whitney* para avaliação dos valores de microtração entre os grupos experimentais